

# 土壤中に於ける纖維素分解に關する研究 (續報)

## 其二 主要好氣性纖維素分解細菌の檢査及び其の概數

農學博士 板野新夫

荒川左千代

(第八卷第六冊第九十二號致謝 昭和七年六月發行日本農藝化學會誌發表)

### 緒言

纖維素は藥物に對して相當強き抵抗性を有するに拘はらず微生物の作用に對しては容易に分解されるものである。

植物殘滓物は其の約五〇%の纖維素を含有してゐるが、是等は土壤中に於ては忽ちに分解され直接には或る微生物の energy 源となり、間接には *Azotobacter*, *Clostridium* 等の如き遊離窒素固定細菌の energy 源として利用され、土壤肥沃増進上に密接な關係のあることは周知の所であつて堆肥の醗酵に關すると共に農業上極めて重要な事項に屬してゐる。

是等纖維素分解に關しては既に廣汎なる業績<sup>(1)(2)</sup>が報告され、定量的に或は定性的に幾多の要項が明にされたが、併し今猶未知の事項が多數存在することは想像に難くない。

扱て好氣性纖維素分解細菌に就て <sup>(3)</sup>Waksman & Skinner, <sup>(4)</sup>Winogradsky, <sup>(5)</sup>Dubos, <sup>(6)</sup>Jensen 及び <sup>(7)</sup>Bokor 等の研究する所に依ると、歐米諸國に於て *Cytophaga hutchinsoni* が最も多く檢出される細菌であると云ふ。

殊に Bokor <sup>(7)</sup> は匈牙利、獨逸各地の耕土に廣く分布する事を認め、森林土に於ても亦相當に廣く分布してゐることを知り砂土に於ては殆んど檢定されなかつたが、糸狀菌に次いで有力なる纖維素分解細菌であると報告した。之に反して Kalins <sup>(8)</sup> は英國土壤の好氣性纖維素分解細菌は主として *Vibrio* 型及 *Bacterium* 型の細菌が最も多く檢出され、*Cytophaga hutchinsoni* の分布は極めて僅少の範圍であると述べた。然れども氏の母國たる Latvia 土壤には最も廣く *Cytophaga* が分布することを知るものゝあつて、是は Latvia 土壤が多くは Podsol 及び泥炭質土壤にて其の  $P_H$  6.0 以下の地域が廣く地力の瘠薄なることに起因するものであらうと報告した。

又 <sup>(6)</sup>Jensen は中性土壤 ( $P_H$  6.5-7.0) に厩肥を施用するときは *Vibrio* 型の纖維素分解細菌が最も多く發育し酸性土壤 ( $P_H$  5.7-6.2) に於ては之に反し *Cytophaga hutchinsoni* が最も多く發育して *Vibrio* 型の出現は既に無く、それ以下の酸性土壤にありては糸狀菌が最も有力であるとし、纖維素分解細菌の分布に對して土壤  $P_H$  價の有力な條件なることを指摘した。

著者等は茲に本邦耕土に於ける主要好氣性纖維素分解細菌の檢定及び其の概數に就きて實驗することを得たのでその成績を報告せんとするものである。

\* 本菌は <sup>(2)</sup>Hutchinson & Clayton (1919年) に依り <sup>(1)</sup>初め *Spirochaeta cytophaga* n. sp. と命名されたが <sup>(5)</sup>Winogradsky (1929年) は *Cytophaga* 屬を新設し *Cytophaga hutchinsoni* n. sp. と改定し <sup>(6)</sup>Bergey (1930年) 等亦是を採用し *Actinomyces*

ales, Mycobacteriaceae に編入した、然るに Polak (1925) は別に Mycococcus の新属を設立することの妥當なる可きを主張し、之に Mycococcus Cytophagus n. sp. と命名し Actinomycetales に編入した、現在 Actinomycetales の科及び属の類別にはかゝる論争裡にあるものがあるので、本文では暫定的に Cytophaga を用ひて置いた、従つて從來 Spirochaeta cytophaga と記載された報告も Cytophaga hutchinsoni と改め續つたので御断りして置く次第である。

## 實 驗

由來纖維素分解細菌の分離に際し常用の培養基を用ゆることは殆ど不可能な事で、殊に肉汁ペプトン寒天及ゲラチン培養基等を用ひた扁平培養に最初より本細菌類の發育するが如きことは全く無いと云つてもよい。かの Cellulomonas 属の如く肉汁ペプトン寒天に培養し得る細菌と雖も其分離には無機培養基<sup>(1)</sup>を必要としたのであつて、最初より加纖維素蛋白質培養基の如きを使用した際には雜菌の繁殖が甚だしくて分離に著るしく支障を來すことは明である。

加之、Cytophaga hutchinsoni の如き有力な細菌は纖維素を唯一の炭素源として發育し Peptone の如き有機質窒素源を不可とするのである。従つて培養基の選擇はその研究目的に依つて最も注意を要するものである。<sup>(5)</sup>Dubos は培養基の選擇に就きて特に研究をなし糸狀菌の特殊發育を防止する目的をも考慮して次示の如き合成液を案出した。

硝 酸 鈣 鹽	0.5g.	鹽 化 鈉	0.5g.	鹽 基 性 鈣 鹽 加 里	1.0g.
硫 酸 鐵	0.01g.	硫 酸 鈣	0.5g.	蒸 溜 水	1000c.c.

注意：反應は Ph 7.5 として用ゐる。

本合成液は各試験管に 5c.c. 宛を注入しこれに豫め用意した濾紙片を半分浸漬し綿栓を施したる後常法に従つて殺菌

するのである。

勿論珪酸ゲル培養は最も優れた培養法であると云はれてゐるが、その調製の困難なこと、取扱ひの不便なこと及び細菌の檢定と同時に其の概數を測定せんとするが如き本研究の目的には使用され難いものである。尙細菌の檢定と數量測定とを併施する目的では<sup>5)</sup>Dubosの主張する如く稀釋法に依るのが最も良法と認めたので其の方法を施行した。

即ち豫め 300 c.c. 容の三角瓶に殺菌水 100 c.c. を用意し之に供試土壤 10 g. を秤量して原液となし、常法に従つて 1:100~100000 となる様に稀釋してゆきその 1 c.c. 宛を培養試験管に接種した。接種試験管は之を 28°C の定溫器内に納め三〇日間に亘つて濾紙分解の状態及び着色の如何を觀察し、併せてアニン水フクシン液を以つて染色した細菌標本を製して鏡檢した。斯る方法に依ると好氣的分解を起して普通は培養液面と空氣の接面より分解するもので、その際濾紙が着色するものと然らざるものがある。而して嫌氣的分解に依つて培養液浸漬部より分解を起すことは甚だ少なく、時に分解を起したものは濾紙浸漬部が黃色に着色し斑點狀に漸次に分解してゆくのを常とした。

供試土壤は新鮮なものを用ゆべきであるが、之を廣く採用し得なかつたので、やむなく所藏の乾燥土壤一二點を用ひた。併し別に當研究所岡場土壤を一二點新鮮のまゝ使用した。又別に參考のため三點の堆肥をも使用した。その種類及び性質を摘要すれば第一表の通りである。

第一表 供試土壤の種類及性質

土壤番號	地 方	種 別	土 性	pH 價	狀 態
------	-----	-----	-----	------	-----

[illegible]

土壌番號	地 方	全數量	纖維素分解細菌に依る濾紙の着色	嫌氣性
22	臺南	田 畑	同	同
23	臺南	田 畑	同	同
24	臺南	田 畑	同	同
25	臺南	田 畑	同	同
26	臺南	田 畑	同	同
27	臺南	田 畑	同	同
28	臺南	田 畑	同	同
29	臺南	田 畑	同	同
30	臺南	田 畑	同	同
堆肥	臺南	田 畑	同	同
1	臺南	田 畑	同	同
2	臺南	田 畑	同	同
3	臺南	田 畑	同	同

注意：Prüfungs土壌黴菌液に就きキノビロソ法を施行して得る結果より算定した。氣乾土壌の水分は約2.5%であつた。

以上の各土壤に就きて得た好氣性纖維素分解細菌の概數及び性状を記載すれば第二表の通りである。

第二表 好氣性纖維素分解細菌の概數及び性状

土壌番號	地 方	全數量	纖維素分解細菌に依る濾紙の着色	嫌氣性
1	臺南	田 畑	同	同
2	臺南	田 畑	同	同
3	臺南	田 畑	同	同

1	北海道波島	10	10	0	0	0	0	0	0
2	山形農試	520	10	10	0	0	0	500	0
3	福島岩根	20	0	10	0	0	0	0	10
4	千葉農試	620	10	100	0	0	0	500	10
5	神奈川大野	10	10	0	0	0	0	0	0
6	神奈川相模	100	100	0	0	0	0	0	0
7	石川農試	0	0	0	0	0	0	0	0
8	福井農試	10	10	0	0	0	0	0	0
9	三重農試	110	10	0	0	0	0	100	0
10	和歌山安原	110	0	0	0	0	0	100	10
11	岡山勝加茂 I	10	10	0	0	0	0	0	0
12	岡山勝加茂 II	100	100	0	0	0	0	0	0
13	岡山新野	100	0	100	0	0	0	0	0
14	岡山倉敷	30	10	0	10	0	0	0	10
15	岡崎倉敷	120	10	0	0	0	0	0	100
16	岡山知事	10	10	0	0	0	0	0	0
17	山口室戸	600	100	0	0	0	0	500	0
18	福岡農試	0	0	0	0	0	0	0	0
19	福岡分	100	100	0	0	0	0	0	0
20	朝鮮農試	110	100	10	0	0	0	0	0
21	臺灣臺北	10	10	0	0	0	0	0	0

22	土	土	土	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0
23	土	土	土	10000	10000	0	0	0	0	0	0	0	0
24	土	土	土	1000	1000	0	0	0	0	0	0	0	0
25	土	土	土	101000	100000	0	0	0	0	1000	0	0	0
26	土	土	土	110000	10000	0	100000	0	0	0	0	0	0
27	土	土	土	10120	10000	0	10	0	0	0	0	0	10
28	土	土	土	100030	100000	0	10	0	0	0	0	0	10
29	土	土	土	101000	100000	0	0	0	0	0	0	0	1000
30	土	土	土	101100	100000	0	0	1000	0	0	0	0	100
堆肥													
1	土	土	土	100000	100000	0	0	0	0	0	0	0	0
2	土	土	土	500	500	0	0	0	0	0	0	0	0
3	土	土	土	500	500	0	0	0	0	0	0	0	0

第二表の結果をみるのに纖維素分解細菌の含有量は氣乾土壤に於て 1g. 當 0.120 を算し、一二一點のうち 500~620 のものが三點、100~120 のものが八點、10~30 のものが九點、0 のものが二點であつた。

然るに新鮮土壤に就ては 1g. 當 100~110000 の含有量を示し、八點のうち 10000~110000 のものが五點、10000~10020 のものが二點、1000 のものが一點であつた。而してこれ等一般細菌の含有量と各土壤の種別及び性質、殊に水素イオン濃度との間に密接なる關係を判然と檢定することは出来なかつたが、併し二三の特殊細菌と水素イオン濃度との



間には分布にも密接な關係がある様である(未發表)。最も大きい影響は土壤を乾燥する時其含有量が著るしく減少することであつた。即ち岡山倉敷土壤一五號及一四號は三〇號及二九號と同種の土壤であつて前者は氣乾貯藏したものである。その結果纖維素分解細菌の含有量は後者の約  $1/1000 \sim 1/10000$  に相當する數量をししか檢定し得なかつた。従つて上記の供試乾燥土壤の原土は該數量より少くとも一〇〇〇倍は多量に含有してゐるものであらうと思はれた。併しこゝに注意すべきことは其數量は變化を來しても、含有する細菌の種類には大した變化を來さぬものゝ如く考へられたことである。

次に細菌の濾紙着色狀態と其の含有量をみるのに、濾紙を黃色に着色せしむるものは全供試土壤三〇點中二五點の多きに達し八三・三%の分布率にて、 $1g$  當に乾燥土壤で  $10 \sim 100$ 、新鮮土壤で  $1000 \sim 100000$  の含有量があつた。淡紅色に着色せしむるものに至ると甚だしく減じ、その分布率は〇・一六%、乾燥土壤  $1g$  當  $10 \sim 100$  を含有し新鮮土壤では檢出されなかつた。全然濾紙に着色しない(無色)のものも分布率は〇・一六%、乾燥土壤  $1g$  當  $100 \sim 500$  の含有量を示して稍多量に含有することを示した。又紅橙色に着色せしむるものは〇・一%の分布率を示した。これは大原農業研究所土壤に於てのみ檢出され乾燥土壤で  $1g$  當  $10$ 、新鮮土壤では  $10 \sim 100000$  を含有し主に水田土壤に檢出された。淡黃色、帶綠黃色に濾紙を着色せしむるものは唯大原農業研究所新鮮畑地土壤に於て檢出されたのみであつた。

是等の濾紙着色と其分解狀態を定性的に觀察するのに、淡黃色と黃色の着色をなすもの最も強く、紅橙色、無色の者が之に次いでゐた。併し是等の無色、紅橙色、紅橙色を生成する菌株は之を繼續して培養する時は往々にしてその分解力が減退し遂に消滅するに至るものがあつた。

この黄色着色菌は之を精査するのに特徴ある *Cytophaga hutchinsoni* であつて、一端の尖つた (Pointed ends) 彎曲した長い線狀型を呈し、其の大きさは  $0.4 \times 3.0 - 5.0 \mu$  であつた。

細胞には Metachromatic granules を有して常に大きな球狀型 (Coccoid forms) を混在してゐた。又紅橙色着色菌は其の形態、大きさは *Cytophaga hutchinsoni* に類似するが色調は全く異なり、*Cytophaga aurantiaca* Winogradsky に酷似してゐた。

淡黄色及び淡緑黄色着色菌は短桿狀 *Vibrio* 型の細菌にて土壤番號三〇畑地土壤より分離したるものは既に細菌學的檢定を遂げた結果 (10) *Cellvibrio calida* n. sp. と命名した。土壤番號二五の果樹園土壤よりは二種の *Vibrio* 型細菌を分離した。淡紅色着色菌は長桿狀型と認むる外に放射狀菌糸の混在することが檢定された。この着色はおそらく放射狀菌に依るものであらうと思はれた。

無着色菌では土壤番號一七 (山口) より分離したるものが稍分解力強く長桿狀型であつた。

以上菌細の純粹分離法は *Cytophaga* 型を除くは纖維素合成寒天上に扁平培養し Enzymic zones を生成する聚落を選択し、之より更に纖維素合成液に移植してその分解力を認めたものは澱粉合成寒天上に聚落を形成させて純粹とした。これ等分離細菌に就いては追つて報告する筈である。

この他同時に檢定した嫌氣性細菌の含有量は〇・三%の分布率を示して甚だ少なく (5) Dubos 等の報告せる如く普通耕土にて重要性の少なきことを暗示すると共に別に好適培養法を用ひない故であらう。

堆肥に就いてみるのに供試堆肥は三點とも *Cytophaga hutchinsoni* を檢定し岡山堆肥 (稍完熟) に最も含有量が多か

つた。

更に培養液を次の如く變更して新に採取した當研究所圃場土壤に就いて纖維素分解細菌の數量を檢定した。

硫酸アムモニヤ 1.0g. 鹽化亜硫酸 0.1g. 鹽基性磷酸加里 1.0g.  
 硫酸 0.01g. 硫酸石灰 0.5g. 蒸溜水 1000 c.c.  
 その結果は第三表に示す通りであつた。

第三表 纖維素分解細菌の概數及び性状

土塊番號	地 方	全數(個)	纖維素分解に依る濾紙の着色				嫌氣性
			黄 色	紅褐色	淡黃色	淡紅色	
31	岡山倉敷(佃)	100000	100000	10000	1000	0	0
32	岡山倉敷(佃)	100000	10000	100	100000	10	0
34	岡山倉敷(佃)	100000	10000	0	100000	100	100
35	岡山倉敷(佃)	100000	10000	100000	100000	0	10

第三表に明かな如く培養液の窒素源を硫酸アムモニヤに變更しても顯著な現象を認めなかつた。唯嫌氣性細菌は硫酸鹽を還元して硫化水素を發生し、ために培養液を黒變せしめた。

## 總 括

土壤中に於ける纖維素分解に關する研究、續報

本文は本邦耕土に分布する主要好氣性纖維素分解細菌及び其の概數を檢定する目的にて氣乾土壤二二點、新鮮土壤一二點及び堆肥三點を供試したる成績であつて、其の檢定は Dobos<sup>(5)</sup> に従つて纖維素合成液を培養基とした稀釋法に依つて行つたものである。

その結果 *Cytophaga hutchinsoni* は全供試土壤の約八六%の分布率を占め、新鮮土壤 1g. 時 1000-100000 の含有量を示して最も廣汎に分布し且つ重要な細菌であることを認めた。

その他 *Pa70-80* の新鮮土壤中には 1g. 當 1000-10000 の割合に含有さるゝ *Cellvibrio* 型の纖維素分解細菌を檢定した。本菌は其分解力が *Cytophaga hutchinsoni* に匹敵するが殊に土壤反應の支配を受くることが多いため分布率が制限される様である。

一般的には新鮮土壤 1g. 當は 1000-100000 の好氣性纖維素分解細菌を含有してゐるが、之を氣乾する時には其の數量は 1/1000-1/10000 に減少した。併しその種類に對しては影響が少ない様である。

耕土に於ける嫌氣性纖維素分解細菌の作用は本法に依つては充分檢定出來なかつた。

尙本實驗に依つて分離した數種の細菌に就ては引續き研究中である。

### 參 考 文 獻

- (1) A. C. Thaysen & H. J. Bunker : The Microbiology of Cellulose, Hemicelluloses, Pepin and Grimes, (1927).
- (2) S. A. Waksman : Principles of Soil Microbiology. (1927).

- (3) S. A. Waksman & C. E. Skinner : Jour. Bact., **12** (1920), 57~86.
- (4) S. Winogradski : Ann. de l'Institut Pasteur, **43** (1929), 549~633.
- (5) R. J. Dubos : Jour. Bact., **15** (1928), 223~234.
- (6) H. L. Jensen : Jour. Agric. Sci. **21** (1931), 81~100.
- (7) R. Bokor : Arc. f. Micro., **1** (1930), 1~34.
- (8) A. Kalnins : Latvijas Univ. Rak. Act. Univ. Latv., Lauksa. Fak. Ser., **1** (1930), 11.
- (9) K. F. Kellerman & I. G. McBeth : Central. Bact., Abt. II, **34** (1921), 487~494.
- (10) A. Itano and S. Arakawa : Proceeding of the Imperial Academy. VII, 367~368, (1932).
- (11) D. H. Bergey : Manual of Determinative Bacteriology, Third Edition, (1930).
- (12) H. B. Hutchinson & J. Clayton : Jour. Agric. Sci., **9** (1919), 143~172.